



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina**

**Escuela Profesional de Tecnología Médica**

**Frecuencia de genes fimH y afa en Escherichia coli  
productoras de betalactamasas de espectro extendido  
aisladas de urocultivos**

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología  
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

**AUTOR**

Jose Fernando MATTA CHUQUISAPON

**ASESOR**

Luis Jesus MAROCHO CHAHUAYO

Esther VALENCIA BAZALAR

Edgar GONZALES ESCALANTE

Carlos Raúl SEVILLA ANDRADE

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Matta J. Frecuencia de genes fimH y afa en *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de urocultivos [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2018.

---



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Medicina**  
**Escuela Profesional de Tecnología Médica**  
"Año del diálogo y la reconciliación nacional"



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Conforme a lo estipulado en el Art. 45.2 y, Art. 100.13 de la Ley 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Directora de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Dr. José María Guevara Granados  
Miembros: Lic. Freddy Villanueva Cotrina  
Lic. Katherine Yauri Condor  
Asesor : Dr. Luis Marocho Chahuayo

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 19 de octubre 2018, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado "**FRECUENCIA DE GENES *fimH* y *afa* EN *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADAS DE UROCULTIVOS – INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "DANIEL ALCIDES CARRIÓN – UNMSM"**", para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica del Bachiller:

**JOSE FERNANDO MATTA CHUQUISAPON**

Habiendo obtenido el calificativo de:

.....18.....  
(en números)

.....dieciocho.....  
(en letras)

Que corresponde a la mención de: .....Muy Bueno.....

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

.....  
Presidente  
Dr. José María Guevara Granados

.....  
Miembro  
Lic. Freddy Villanueva Cotrina

.....  
Miembro  
Lic. Katherine Yauri Condor



.....  
Asesor (a) de Tesis  
Dr. Luis Marocho Chahuayo

FRECUENCIA DE GENES *fimH* y *afa* EN *Escherichia coli*  
PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO  
EXTENDIDO AISLADAS DE UROCULTIVOS

**AUTOR:**

Bachiller MATTA CHUQUISAPON, JOSE FERNANDO

**ASESOR:**

Dr. Luis Jesús Marocho Chahuayo

**COASESORES:**

Lic. TM. Esther Valencia Bazalar

Lic. TM. Edgar Gonzales Escalante

Lic. TM. Carlos Raúl Sevilla Andrade

## Dedicatoria

A mi familia,

Mi madre Armencia Chuquisapon, por el amor e incasable apoyo en todas las metas que me propongo.

A mi hermano Marco Matta, por sus consejos y camaradería.

Para ustedes va dedicado todo.

## Agradecimientos

Al Dr. Luis Jesús Marocho Chahuayo,

Por su asesoría, confianza y facilidades brindadas para el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la Lic. TM. Esther Valencia Bazalar,

Por su asesoría, paciencia, consejos, tiempo brindado y, sobre todo, por todo el conocimiento brindado desde el pregrado.

Al Lic. TM. Carlos Raúl Sevilla Andrade,

Por la oportunidad que me dio, siempre brindando su tiempo, conocimiento y facilidades para realizar este trabajo.

Al Lic. TM. Edgar Gonzales Escalante,

Por su amistad, apoyo y confianza. Por ayudarme a descubrir que mi camino es la microbiología y que el conocimiento se lo forma uno mismo.

Al Lic. Elbert Tolentino,

Por el apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Jorge Alarcón Villaverde, Director Ejecutivo del Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales – CITBM.

El más sincero agradecimiento por el apoyo a la Magister(c) Milagros Zavaleta Apéstegui, Coordinadora del CITBM y a todo el personal del laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética – LEMYG.

Al Grupo de Investigación en Resistencia a los Antimicrobianos (MICRESIS) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Y a todas las personas que me ayudaron en la realización de este trabajo, de cualquier manera y magnitud.

A todos muchas gracias.

# ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES.....	11
1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN .....	13
1.3. OBJETIVOS.....	14
1.3.1. Objetivo general	
1.3.2. Objetivos específicos	
1.4. BASES TEÓRICAS.....	15
1.4.1. BASE TEÓRICA .....	15
1.4.2. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS .....	27
1.4.3. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS.....	27
CAPÍTULO II: MÉTODOS.....	29
2.1. DISEÑO METODOLÓGICO .....	29
2.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN .....	29
2.1.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....	29
2.1.3. POBLACIÓN .....	29
2.1.4. MUESTRA Y MUESTREO .....	29
2.1.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	
2.1.4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	
2.1.5. VARIABLES.....	30
2.1.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	31
2.1.7. PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS.....	31
2.1.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	35
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....	36
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....	45
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
ANEXOS .....	58



## LISTA DE TABLAS

**TABLA N° 1:** Características y receptores de la adhesina Afa.

**TABLA N° 2:** Clasificación de betalactamasas de Bush – Jacoby.

**TABLA N° 3:** Características de la secuencia de oligonucleótidos del primer del gen *fimH*.

**TABLA N° 4:** Mastermix de la PCR para el gen *fimH*.

**TABLA N° 5:** Características de la secuencia de oligonucleótidos del primer del gen *afa*.

**TABLA N° 6:** Mastermix de la PCR para el gen *afa*.

**TABLA N° 7:** Distribución de las muestras por grupo etario en la niñez.

**TABLA N° 8:** Distribución de las muestras según servicio de procedencia.

**TABLA N° 9:** Perfil de susceptibilidad los antimicrobianos de los aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE.

**TABLA N° 10:** Relación entre factores de virulencia y la resistencia antibiótica en los aislamientos de *Escherichia coli* productora de BLEE.

**TABLA N° 11:** Relación entre factores de virulencia y la procedencia de los aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE.

**TABLA N° 12:** Relación entre factores de virulencia de los aislamientos de *Escherichia coli* productora de BLEE y grupo etario.

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Organización genética de los operones *afa*.

**Gráfico 2.** Mecanismos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos.

## **RESUMEN:**

**Introducción:** *Escherichia coli* es el bacilo Gram negativo aislado con mayor frecuencia en las infecciones del tracto urinario en pacientes ambulatorios y hospitalizados. La gravedad de la infección dependerá de los factores de virulencia que tenga y de los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos como las betalactamasa de espectro extendido (BLEE) que confieren un perfil de multirresistencia. Se desconocen referencias del perfil de virulencia de las cepas causantes de infecciones del tracto urinario en nuestro medio.

**Diseño:** Estudio transversal, prospectivo y descriptivo.

**Objetivo:** Determinar la frecuencia de los genes de las adhesinas *fimH* y *afa* en cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de urocultivos. Así mismo, describir la resistencia acompañante de las cepas de *Escherichia coli* productora de BLEE, su distribución por procedencia y grupo etario.

**Método:** Se estudiaron un total de 75 aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE pertenecientes al cepario obtenido del proyecto TO-06/09 realizado en el INSN durante el periodo Octubre – Diciembre del 2012 almacenadas en el Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” – Facultad de Medicina - UNMSM. A todos los aislados se les realizó la detección genotípica de los genes *fimH* y *afa* a través de una PCR convencional.

**Resultados:** Para el gen *fimH*, se obtuvo una frecuencia de positivos del 98,6 % (74/75), para el gen *afa* una frecuencia del 8 % (6/75). No se observó una posible asociación entre los factores de virulencia y la edad, ni procedencia. El gen *fimH* tampoco tuvo asociación con respecto al perfil de resistencia, pero el gen *afa* si mostró una posible asociación con un antibiótico aminoglucósido.

**Conclusiones:** Se halló una alta frecuencia para el gen *fimH* y una baja frecuencia para el gen *afa*. No se observó una posible asociación entre los factores de virulencia con las demás variables (edad, procedencia, perfil de resistencia) con excepción de *afa* y su relación significativa con amikacina.

**Palabras clave:** *Escherichia coli* uropatógena, factores de virulencia, BLEE.

## **ABSTRACT:**

**Introduction:** *Escherichia coli* is the Gram negative rods isolated most frequently in urinary tract infections in outpatients and inpatients. The severity of the infection will depend on the virulence factors that also have the mechanisms of resistance to antimicrobials such as beta-lactamase extended spectrum (ESBL) that confer a multi-resistance profile. The virulence profile of the strains causing urinary tract infections in our environment is not known.

**Design:** Cross-sectional, prospective and descriptive study.

**Objective:** To determine the frequency of *fimH* and *afa* genes in ESBL-producing *Escherichia coli* strains isolated from urine cultures. Also describe the accompanying resistance of the strains of *Escherichia coli* producing ESBL, its distribution by provenance and age group.

**Method:** A total of 75 ESBL-producing *Escherichia coli* isolates belonging to the strain obtained from the TO-06/09 project carried out in the INSN during the period October - December 2012, which are stored in the Institute of Tropical Medicine "Daniel Alcides Carrión" - School of Medicine - UNMSM. All isolates underwent genotypic detection of the *fimH* and *afa* genes through conventional PCR.

**Results:** For the *fimH* gene, a positive frequency of 98.6% (74/75) was obtained, for the *afa* gene a frequency of 8% (6/75). No possible association was observed between virulence factors and age or provenance. The *fimH* gene also had no association with respect to the resistance profile, but the *afa* gene did show a possible association with an aminoglycoside antibiotic.

**Conclusions:** A high frequency was found for the *fimH* gene and a low frequency for the *afa* gene. No possible association was observed between the virulence factors with the other variables (age, origin, resistance profile) with the exception of *afa* and its possible relationship with amikacin.

**Key words:** *Escherichia coli* uropathogenic, virulence factors, ESBL.

CAPÍTULO I:  
INTRODUCCIÓN

## 1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

La infección del tracto urinario (ITU) es una infección muy común y se presenta generalmente en mujeres sin enfermedad de base y sin anomalías funcionales ni estructurales del tracto urinario <sup>(1)</sup>. Estas infecciones se dan en el 1 al 3 % de los jóvenes en edad escolar y después su incidencia aumenta al comenzar la actividad sexual en la adolescencia. Se calcula que entre el 50 y el 60 % de las mujeres adultas tendrán al menos un episodio de ITU en su vida <sup>(2)</sup>. Alrededor del 20 % de las mujeres jóvenes que presentan un episodio inicial de cistitis tienen una infección recurrente que, en ocasiones, se deben a persistencia de focos infecciosos, pero en el 90 % de los casos obedecen a mecanismos de reinfección exógena <sup>(3)</sup>.

La ITU es una de las infecciones bacterianas más frecuentes en la infancia. Alrededor del 5-8 % de niños y niñas menores de 2 años con fiebre sin foco definido tienen una ITU <sup>(4)</sup>. A los 7 años, aproximadamente, 8% de las niñas y 2 % de los varones han tenido al menos un episodio de ITU y el riesgo de que la ITU recurra es de 10 a 30 %, en los siguientes 6 a 18 meses. La ITU febril en los niños pequeños, o la que se presenta en niños con una anomalía importante de las vías urinarias (reflujo vesicoureteral intenso, obstrucción, vejiga neurógena) puede ocasionar daño renal permanente <sup>(5)</sup>.

La ITU es la causa más frecuente de sepsis por Gram negativos <sup>(5)</sup>. Por otra parte, las tasas de resistencia a los antimicrobianos de estos uropatógenos han experimentado importantes variaciones, por lo que el tratamiento empírico de la ITU requiere la constante actualización de la sensibilidad antibiótica de los principales uropatógenos causantes de infección urinaria de la institución, zona geográfica o país donde se estudien. El conocimiento de los patrones de sensibilidad de las bacterias más frecuentes que causan ITU en el ámbito local, es importante para seleccionar una terapia empírica apropiada. La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (SAEI) recomienda que se lleven a cabo estudios periódicos de vigilancia para monitorizar cambios en la sensibilidad antibiótica de los uropatógenos <sup>(6)</sup>.

La invasión del aparato urinario sano está restringida a un grupo de microorganismos generalmente comensales llamados uropatógenos, que son capaces de sobrepasar y minimizar los mecanismos de defensa del hospedero siendo *Escherichia coli* el causante del 85 % de los episodios de cistitis aguda no complicada <sup>(7,8)</sup>. A la cepa de *E. coli* capaz de invadir el tejido del tracto urinario se le conoce como *Escherichia coli* uropatógena (UPEC). Esta presenta diversos factores de virulencia entre los que se incluyen factores de adherencia (fimbrias P, fimbrias tipo 1, y adhesinas como fimH, S, M FIC, Dr, afa, sfa), alfa hemolisina (Hly), lipopolisacárido (LPS), aerobactinas, proteasas autotrasportadoras (Sat) y Factor Necrosante Citotóxico 1 (CNF-1) y mayor producción de antígeno capsular (antígeno K) <sup>(9)</sup>.

Los factores de virulencia van a determinar la capacidad de infección de la bacteria, la cronicidad de la enfermedad, su posible recurrencia e invasión a otros tejidos. FimH, adhesina presente en casi todas las cepas UPEC con una frecuencia mayor al 80 % en los aislamientos de *E. coli* causante de ITU <sup>(10,11)</sup>. Esta adhesina, es la responsable de la adhesión de la bacteria al urotelio, favoreciendo así la colonización y posterior invasión al tejido urinario. Spaulding C. 2017 <sup>(10)</sup> mediante un ensayo en ratones, utilizó inhibidores de la adhesión de FimH a sus receptores en las células epiteliales y obtuvo como resultado una disminución considerable tanto de la colonización intestinal como de la capacidad de invadir el urotelio por *E. coli*.

La adhesina Afa, descrita por primera vez por Le Bouguenec en 1993 <sup>(12)</sup> como una adhesina relacionada las ITU y las infecciones intestinales causadas por *Escherichia coli*. La adhesina Afa es de frecuencia variable, con valores no mayores al 40% <sup>(13,14)</sup> pero si con un rol importante en las infecciones en embarazadas y niños por la capacidad de causar complicaciones <sup>(15)</sup>.

Esto favorece el desarrollo de la enfermedad sumado a los mecanismos de resistencia, como la producción de BLEE que confiere resistencia a los betalactámicos desde penicilinas hasta cefalosporinas de 4ta generación incluyendo aztreonam, complicando el tratamiento empírico.

La necesidad de saber la situación actual de la distribución de algunos de estos factores de virulencia, lleva a plantear la siguiente pregunta: ¿Cuál es la frecuencia de los genes *fimH* y *afa* en los aislados de *Escherichia coli* uropatógenas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de urocultivos?

## 1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) son, dentro de las infecciones bacterianas, las más frecuentes en el ser humano. Los agentes etiológicos de este tipo de infección son generalmente bacilos Gram negativos, siendo *E. coli* el de mayor frecuencia. La alta incidencia de las ITUs, junto a su morbilidad y mortalidad (foco de bacteriemia y sepsis), representan un importante reto a la hora de establecer su diagnóstico y tratamiento <sup>(16)</sup>.

Además, *Escherichia coli* ha desarrollado resistencia a los betalactámicos a través de diferentes mecanismos, como las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Las BLEE, confieren un patrón de multiresistencia y esto supone una gran dificultad terapéutica, que explica su asociación en numerosos estudios con mayor mortalidad, mayor duración de la estancia hospitalaria y aumento de costo económico <sup>(17)</sup>.

Se ha descrito a la adhesina *fimH* como el factor de virulencia más frecuente en aislados de UPEC con más del 80 % de los casos <sup>(18)</sup>. La adhesina FimH es responsable de la capacidad de los aislados de UPEC de colonizar el intestino favoreciendo los reservorios de este. Además, se ha descrito una asociación entre el la adhesina *fimH* y la capacidad de *Escherichia coli* de formar “colonias bacterianas intracelulares” en la patogénesis de las ITU <sup>(13)</sup>. Estas formaciones intracelulares en el urotelio, le sirve para protegerse de los mecanismos de defensa del hospedero cambiando de forma de bacilos a bacilos cortos, evadiendo la respuesta inmunitaria <sup>(19)</sup>. Por su parte, la adhesina *afa*, confiere un mayor tropismo por el epitelio renal, está fuertemente asociado con las infecciones recurrentes, la cronicidad de la infección y con ITU en embarazadas y niños. Además, es responsable de la complicación por infecciones



gestacionales y/o pielonefritis, aumentado la morbilidad y mortalidad en las gestantes<sup>(20)</sup>. Sumado a lo expuesto anteriormente, la producción BLEE trae como problema el fallo del tratamiento empírico que se agrava con la presencia de factores de virulencia en los aislados de UPEC.

### 1.3. OBJETIVOS

#### 1.3.1. Objetivo general

- Determinar la frecuencia de los genes *fimH* y *afa* en cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de urocultivos.

#### 1.3.2. Objetivo específicos

- Estandarizar y optimizar una PCR convencional para el gen *afa*.
- Describir la resistencia acompañante de las cepas de *Escherichia coli* productora de BLEE.
- Describir la frecuencia de factores de virulencia con relación a la resistencia a los antibióticos.
- Describir la frecuencia de los factores de virulencia según procedencia de las cepas obtenidas (hospitalizados y ambulatorios).

## 1.4. BASES TEÓRICAS

### 1.4.1. BASE TEÓRICA

#### **INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO**

La infección del tracto urinario (ITU) consiste en la colonización y multiplicación microbiana, habitualmente bacteriana, a lo largo del tracto urinario aún sin presencia de síntomas. Se denomina pielonefritis si afecta al riñón y la pelvis renal (ITUs de vías urinarias altas), cistitis si implica a la vejiga, uretritis si afecta a la uretra y prostatitis si la infección se localiza en la próstata (ITUs de vías urinarias bajas) <sup>(21)</sup>.

Los agentes etiológicos de ITU, generalmente, provienen de la propia microbiota intestinal del paciente, siendo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Enterococcus faecalis*, los más frecuentes en pacientes ambulatorios; y *Enterobacter* spp, *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp. y levaduras como *Candida* spp. en pacientes hospitalizados <sup>(22)</sup>.

#### **EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ITUs**

Las ITUs representan una de las primeras causas de consulta médica y hospitalizaciones. Estudios epidemiológicos por E. H. Kass (23) mostraron que los recuentos bacterianos mayores de  $10^5$  UFC/mL, de un cultivo puro de bacilos gram negativos en orina estaban asociados con infecciones agudas bacterianas del tracto urinario. Otros investigadores reportaron que también podrían ser significativos los recuentos mayores de  $10^2$  UFC/mL en mujeres con disuria e ITU aguda <sup>(24)</sup>.

Las mujeres jóvenes son comúnmente afectadas, con una frecuencia estimada de 0,5 a 0,7 infecciones por año. Del total de las mujeres afectadas por una ITU, aproximadamente el 30 % desarrollará infecciones recurrentes que no están relacionadas con alguna anomalía

del tracto urinario. La incidencia estimada de ITU en los hombres jóvenes con respecto a las mujeres de la misma edad es significativamente inferior (5 hombres por cada 8 mujeres infectadas por 10 000 habitantes). La prevalencia de ITUs o bacteriuria asintomática en el anciano es de 10 a 50 %, y es moderadamente más elevada en las mujeres ancianas <sup>(25)</sup>.

La ITU es una de las infecciones bacterianas más frecuentes de la infancia. A los 7 años, aproximadamente 8 % de las niñas y 2 % de los varones han tenido al menos un episodio de ITU. El riesgo de que la ITU recurra es de 10 % a 30 %, en los siguientes 6 a 18 meses. Las infecciones urinarias asociadas con sondas vesicales constituyen el 35 % a 40 % de todas las infecciones nosocomiales; en general, 10 % de los pacientes cateterizados por corto tiempo (< 7 días) y 15 % de los cateterizados por más de 7 días desarrollan infección, con un riesgo diario de 5 %. La ITU es la causa más frecuente de sepsis por Gram negativos <sup>(25)</sup>.

### ***Escherichia coli***

Es un bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, comensal más abundante de la microbiota, no formador de esporas, móvil, flagelos peritrico, anaerobio facultativo, microorganismo no exigente, fermentador y oxidativo de glucosa, catalasa (+), oxidasa (-) y reductor de nitrato a nitrito <sup>(26)</sup>.

*E. coli* se serotipifica sobre la base de sus antígenos de superficie O (somático), H (flagelar) y K (capsular). En la actualidad se reconoce más de 170 serogrupos diferentes de antígenos O. *E. coli* es la especie bacteriana recuperada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que afectan casi a cualquier tejido. Es uno de los microorganismos más frecuentes involucrados en la sepsis por Gram negativos y en el shock séptico inducido por endotoxinas. Otras infecciones habituales por *Escherichia coli* son infecciones de heridas, neumonía en pacientes hospitalizados inmunosuprimidos y la meningitis en los recién nacidos <sup>(27)</sup>.

## **FILOGRUPOS DE *Escherichia coli***

*Escherichia coli* puede ser agrupada en 7 filogrupos: A, B1, B2, C, D, E y F en base a la distribución de genes determinados por el método MLST (Multilocus Sequence Typing). En estos filogrupos, se encuentran distribuidos todos los patotipos de *Escherichia coli*, como las Uropatógenas (UPEC), las que están asociadas a meningitis neonatal (NMEC), patógenas intestinales (IPEC), etc. Los filogrupos B2, D y F son los que se encuentran asociados con infecciones extraintestinales (como las ITUs, por ejemplo), aunque puede haber variaciones dependiendo de la localización geográfica <sup>(28)</sup>.

### ***Escherichia coli* UROPATÓGENA**

*E. coli* uropatógenas (UPEC) es una de las *E. coli* extra intestinales (ExPEC) que se asocian con mayor frecuencia a infecciones en humanos. Estas bacterias son la causa primaria de las infecciones del tracto urinario (ITU) adquirido en comunidad (70- 95 %) y una gran proporción de ITU nosocomiales (50 %) <sup>(29)</sup>, lo que significa un incremento de gastos médicos y morbilidad en todo el mundo. Las ITUs recurrentes (3 o más ITU sintomático en 12 meses) o reinfecciones (producida por bacterias que provienen de fuera del tracto urinario y que se presenta después de 2 semanas de iniciar el tratamiento), son especialmente problemáticas. Las cepas UPEC actúan como patógenos oportunistas, aprovechando el comportamiento del hospedero y su susceptibilidad empleando un diverso repertorio de factores de virulencia para colonizar el tracto urinario. La diseminación de UPEC en la comunidad puede ser a través de alimentos contaminados u otros consumibles colonizando así el tracto intestinal <sup>(30)</sup>.

## FACTORES DE VIRULENCIA

El genoma de las *Escherichia coli* patógenas extraintestinales, como las uropatógenas, son notablemente más grandes que las cepas de *Escherichia coli* comensales o K12 (4'639,221 pares de bases de DNA circular de doble cadena para la K12), probablemente porque contienen más genes necesarios para sobrevivir fuera del tracto intestinal <sup>(31)</sup>. Los genomas de los aislados de la UPEC contienen entre 8-22 % más marcos de lectura abierta y son 6-13 % más grande que el genoma de la cepa de referencia K12 <sup>(30)</sup>. Las cepas UPEC tienen factores de virulencia que les permiten colonizar el tracto urinario y sobrevivir a la defensa del hospedero. Las cepas UPEC poseen una gran diversidad de genes de virulencia localizados en las llamadas islas de patogenicidad (PAIs).

Los factores de virulencia pueden ser divididos en dos grupos: los factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana y los factores de virulencia que son secretados al sitio de acción <sup>(32)</sup>.

## FACTORES DE VIRULENCIA DE LA SUPERFICIE BACTERIANA

Estos factores de virulencia son los más importantes en la patogenicidad de las UPEC. Las adhesinas pueden contribuir a la virulencia en diferentes maneras: atacando directamente al hospedero, facilitando el transporte de productos bacterianos para la invasión de tejidos y promoviendo la invasión bacteriana.

### **Fimbria tipo 1 y fimH:**

La fimbria tipo 1, es esencial en la colonización, invasión y persistencia de la infección. Está estructurado de alrededor de 1,000 copias de la subunidad mayor, FimA, y una pequeña cantidad de los componentes menores (FimF, FimG, FimH). No se ha podido entender completamente su rol como factor de virulencia debido a que se expresa de igual manera en cepas patógenas y comensales. En modelos murinos, se ha demostrado

que la fimbria tipo 1 mejora la supervivencia bacteriana, estimula la inflamación de la mucosa y promueve la invasión y la formación de biofilm. En el urotelio, se une a unas glicoproteínas llamadas uroplaquinas a través de la adhesina FimH, localizada en la punta de la fimbria <sup>(32)</sup>.

La adhesina FimH es elemento de reconocimiento de la fimbria tipo 1, localizada en el extremo de la organela. Está presente en más del 90 % de los aislamientos de UPEC. También está asociada a la bacteriemia por traslocación intestinal en pacientes inmunosuprimidos. En el inicio de la invasión al epitelio renal, se une a las uroplaquinas e integrinas que están en la superficie de las células del tracto urinario. La unión de la adhesina FimH a la uroplaquina induce la reorganización de la actina y la internalización de la bacteria en el epitelio renal, además de promover apoptosis en las células epiteliales debido al aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Sin embargo, la interacción de la adhesina con las proteínas de Tamm-Horsfall, producidas por el riñón (Asa de Henle y parte del túbulo colector renal), hace que la adhesina FimH pierda la capacidad de unión a las células del epitelio.

Esta internalización es responsable de la formación de colonias bacterianas intracelulares (CBI), la cual es un mecanismo para la evasión de la respuesta inmune. Luego de la internalización y un proceso de replicación, estas colonias intracelulares salen a la luz del tracto urinario para invadir otras células epiteliales y así formar más CBI <sup>(19,32)</sup>.

### **La fimbria P:**

Fimbria que cumple un importante rol en la patogénesis de la ITU ascendente y pielonefritis en humanos. Está conformada por diferentes subunidades proteicas, codificadas por el operón *papA-K*. Esta fimbria reconoce los glicoesfingolípidos del riñón, liberando ceramida que actúa como un agonista de los receptores tipo toll-4. Esta interacción es la responsable de la inflamación local y el dolor que se produce en

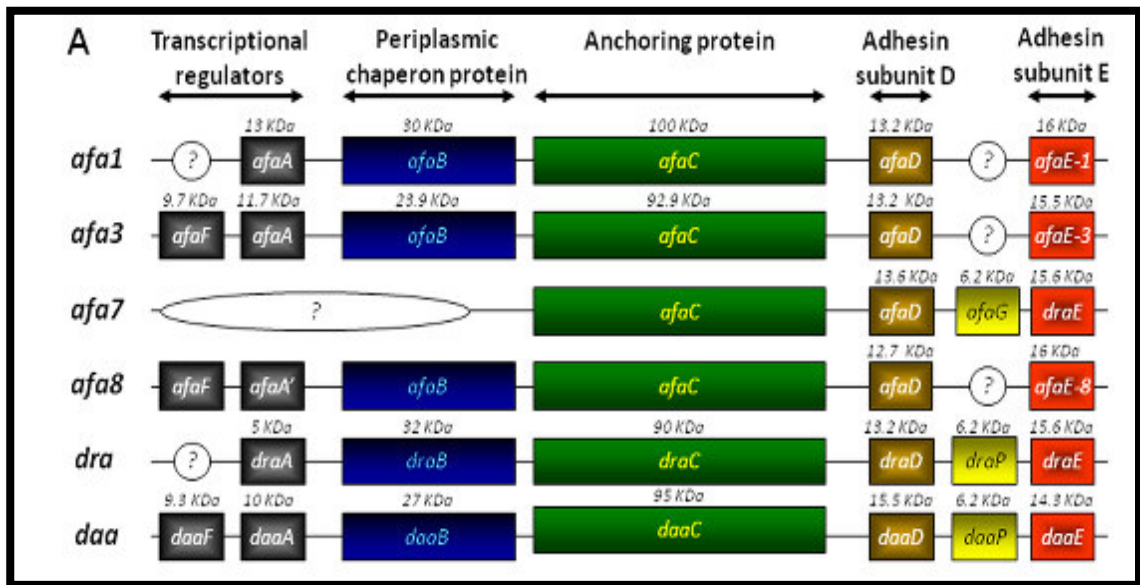
la infección ascendente. Se ha demostrado que la fimbria P potencia la colonización temprana del epitelio tubular, mientras que la fimbria tipo 1 promueve la internalización de túbulo renal. La interacción inter-bacteria dentro del túbulo renal afecta la filtración renal y conduce la obstrucción total de la nefrona, siendo esta la fisiopatología completa de la pielonefritis <sup>(32,33)</sup>.

### **Las fimbrias S y F1C:**

También están implicadas en la adhesión al tejido del tracto urinario y riñón. La fimbria S está implicada en la diseminación bacteriana a otros tejidos causando sepsis, meningitis e ITUs ascendentes <sup>(32,34)</sup>.

### **Adhesina *afa* (afimbrial adhesins):**

La primera vez que se aisló esta adhesina fue en el serotipo salvaje de UPEC KS52. Este gen es altamente conservado en el patotipo DAEC (*diffusely adherent Escherichia coli*) junto con los genes *daaC* y *Dr*. En este patotipo de *Escherichia coli*, se encontró que los genes *afaBC/daaC* fueron encontrados en cepas productoras de ITUs, pertenecientes al filogrupa B2 <sup>(35)</sup>. Esta adhesina está codificada por genes presentes en un operón que contiene 5 genes principales, del gen A al gen D, altamente conservados que codifican proteínas accesorias y genes más divergentes, como el gen E, que codifican más subunidades de la adhesina (**Gráfico 1**).



**Gráfico 1. Organización genética de los operones *afa*. Servin, 2014 <sup>(28)</sup>.**

Existen además, distintos subtipos del operón *afa*, como el operón *afa-3* el cual tiene un gen más, *afaF*. La subunidad *afaE*, es la responsable de la unión al epitelio renal. También se ha determinado que las cepas de *Escherichia coli* que poseen este gen, pueden causar infecciones del tracto urinario y diarrea en niños menores de 5 años y en algunos casos en adultos. Se ha observado además, que las cepas de *Escherichia coli* portadoras de este gen son parte de la microbiota no solo de humanos, sino también de animales <sup>(28)</sup>.

El rol de la expresión de las adhesinas Afa en las ITUs recurrentes ya está establecido. Estudios epidemiológicos muestran que los aislamientos que expresan esta adhesina están involucrados en el desarrollo de cistitis en niños y pielonefritis en adultos. En pacientes con pielonefritis, se ha encontrado una amplia distribución de subtipos de *afaE*. En mujeres embarazadas, esta adhesina es un factor de riesgo para el desarrollo de pielonefritis y de labor de parto prematuro, además de estar asociado a complicaciones en el embarazo debido a la sobreexpresión de los receptores de esta adhesina (**Tabla 1**), que se expresan en el epitelio de glándulas del endometrio, arteriolas y arterias del miometrio <sup>(15,32)</sup>.



**Tabla 1. Características y receptores de la adhesina Afa**

Adhesina	Tipo	Hospedero	Receptores		
			Colágeno tipo IV	hDAF	hCEACAMs
<b>AfaE-I</b>	Afimbrilar	Humano	No	Si	Si
<b>AfaE-II</b>	Afimbrilar	Humano	Desconocido	Si	Desconocido
<b>AfaE-III</b>	Afimbrilar	Humano	No	Si	Si
<b>AfaE-IV</b>	Afimbrilar	Humano	Desconocido	Si	Si
<b>AfaE-VII</b>	Afimbrilar	Bovino	Desconocido	n	Desconocido
<b>AfaE-VIII</b>	Afimbrilar	Humano/animal	Desconocido	n	No
<b>Dr</b>	Fimbrilar	Humano	Positivo	Si	Si
<b>Dr-II</b>	Afimbrilar	Humano	No	Si	No
<b>F1845</b>	Fimbrilar	Humano	No	Si	Si

**Tipos y receptores de la adhesina Afa. Servin, 2014 (15).**

hCEACAM: molécula de adhesión relacionado al antígeno carcinoembrionario.

hDAF: Factor de aceleración de decaimiento del complemento.

### **Adesina Dr:**

Se une al colágeno tipo IV y al factor de aceleración de la desintegración (hDAF) en el riñón. Además, se ha demostrado que las adhesinas Dr muestran un tropismo por la membrana basal de las células renales en un modelo ratón, por lo que son determinantes en el desarrollo de pielonefritis crónica <sup>(15)</sup>.

### **La cápsula:**

La cápsula por su parte, brinda protección contra la fagocitosis y el efecto bactericida del complemento además, de tener cierto mimetismo molecular con las células del hospedero disminuyendo la respuesta humoral <sup>(24,30)</sup>.

### **Los sideróforos:**

Son estructuras que le permiten capturar el hierro a las cepas UPEC para poder sobrevivir fuera del intestino donde la concentración de hierro es mayor. UPEC puede sintetizar 2 tipos de sideróforos llamados: yersiniabactina (HPI, isla de alta

patogenicidad) y aerobactina (*iuc*). Diversos estudios han demostrado la asociación significativa entre la aerobactina con la cistitis y pielonefritis <sup>(32,37)</sup>.

### **Los flagelos:**

Organela responsable de la motilidad bacteriana, también es un factor de virulencia por su interacción con las células epiteliales del hospedero y el túbulo colector renal, a través de la flagelina que actúa como una invasina. Otros estudios también sugieren que los flagelos son importantes para el ascenso de las bacterias de la vejiga hacia el riñón <sup>(32,38)</sup>.

## **FACTORES DE VIRULENCIA SECRETADOS AL SITIO DE ACCIÓN**

### **Hemolisinas:**

El factor de virulencia secretado más importante es una lipoproteína llamada alfa hemolisina (HlyA), que está asociada con pielonefritis e ITU del tracto alto. Es una toxina productora de poro, que a altas concentraciones es capaz de lisar hematíes y células nucleadas del hospedero que le permite, además, atravesar la barrera mucosa y poder acceder a los nutrientes del hospedero. A bajas concentraciones es capaz de inducir la apoptosis de neutrófilos, linfocitos, células renales y promover la exfoliación de células epiteliales de la vejiga <sup>(32,39)</sup>.

### **Factor necrotizante citotóxico 1 (CNF1)**

Producido por un tercio de las cepas causantes de pielonefritis y, además, está involucrado en la invasión al riñón. Esta proteína es secretada por UPEC y estimula la formación de fibras de actina y en la alteración de la membrana de las células epiteliales del hospedero para permitir la entrada de las bacterias al interior. En estudios *in vitro* se ha visto que son capaces de interferir en la fagocitosis de los

polimorfonucleares y estimula la apoptosis de las células epiteliales de la vejiga <sup>(32,40)</sup>.

Otras toxinas son Vat y Sat (vacuolating autotransporter toxin y secreted autotransporter toxin, respectivamente). Las toxinas Vat y Sat fueron descritas en un inicio con capacidad para producir una variedad de efectos citopáticos, vacuolización e hinchazón de las células. Además, la expresión de Sat en modelos animales ha mostrado capacidad para producir daño renal severo como disolución del glomérulo, pérdida del epitelio tubular renal y vacuolización de las células de ratones <sup>(30,32)</sup>.

## RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana es la condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana, de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico <sup>(41)</sup>. Se conocen diversos mecanismos de resistencia en bacterias, entre ellas tenemos: modificación enzimática del antibiótico, bombas de expulsión, cambios en la permeabilidad de la membrana externa y alteraciones del sitio de acción <sup>(42)</sup>.

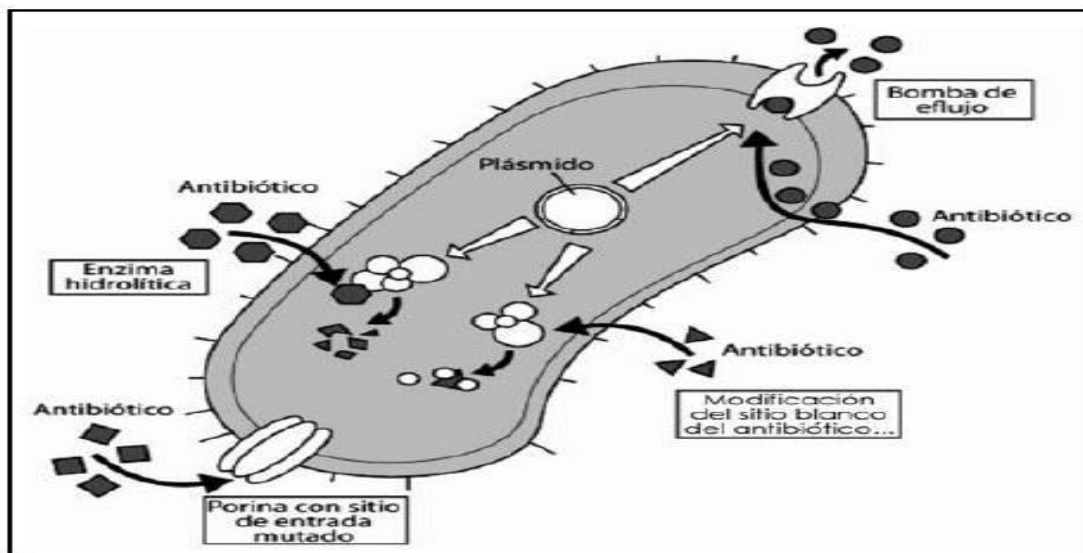


Gráfico 2. Mecanismos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos.

Moreno C., 2009 (43).

**MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ANTIBIÓTICO:** La bacteria es capaz de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que pierda su funcionalidad. La más prevalente son las betalactamasas, pero también existen enzimas modificadoras de aminoglicósidos <sup>(42)</sup>.

**BOMBAS DE EXPULSIÓN:** Son bombas que expulsan el antibiótico situado en el espacio periplasmático hacia el exterior de la bacteria, evitando así, que el antibiótico llegue al sitio de acción <sup>(42)</sup>.

**CAMBIOS EN LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA:** Cambios en estructuras de la membrana, porinas, que son las responsables de regular la entrada de algunos elementos, como los antibióticos. Cambios en la conformación de estos hacen que el antibiótico no pueda ingresar al espacio periplasmático <sup>(42)</sup>.

**ALTERACIÓN DEL SITIO DE ACCIÓN:** Algunas bacterias, como los Gram negativos, tienen la capacidad de alterar el sitio donde el antibiótico se une en la bacteria, para así interrumpir la función del antibiótico <sup>(42)</sup>.

## **BETALACTAMASAS**

Todos los antibióticos betalactámicos tiene en común en su estructura molecular un anillo betalactámico el cual es responsable de su acción antimicrobiana. Las betalactamasas son enzimas capaces de romper este anillo y como consecuencia, inactivar el antibiótico. Las betalactamasas son comunes en Gram negativos y representan una forma importante de resistencia. Los genes que codifican estas enzimas pueden ser cromosómicos o plasmídicos, facilitando así su diseminación representando un gran problema para su control <sup>(42)</sup>. Existen dos clasificaciones para las betalactamasas (**Tabla 2**), según su estructura molecular de Ambler (clase A, B, C y D) y según su funcionalidad de Bush (Grupo 1 ,2 y 3).

**Tabla 2. Clasificación de betalactamasas de Bush – Jacoby**

BUSH-JACOBY GRUPO 2009	CLASE MOLECULAR AMBLER	SUSTRATO	INHIBIDOR		ENZIMA REPRESENTATIVA
			AM C	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	NO	NO	ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	NO	NO	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilias	SI	NO	PC1
2b	A	Penicilias, cefalosporinas	SI	NO	TEM-1, TEM-2, SHV1
<b>2be</b>	<b>A</b>	<b>Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>	<b>TEM-3, SHV-2, CTX-M- 15, PER-1, VEB-1</b>
2br	A	Penicilinas	NO	NO	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	NO	NO	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	SI	NO	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilina	SI	NO	RTG-4
2d	D	cloxacilina	V	NO	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	V	NO	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenémicos	V	NO	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	SI	NO	CepA
2f	A	carbapenémicos	NO	NO	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Carbapenémicos	NO	SI	IMP-1, VIM- 1, CcrA, IND-1
3b	B	Carbapenémicos	NO	SI	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1

Clasificación de las betalactamasas. Bush K., *et al.* 2010 (44). AMC: Amoxicilina-

Clavulanico, EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético. V: variable

## BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

Las betalactamasas de espectro extendido (Clase A o grupo 2be) se definen como enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, todas las cefalosporinas y las monobactámicos, pero no las carbapenémicos ni cefamicinas. Se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. En 1983 se descubrió en

Alemania la primera enzima capaz de hidrolizar las cefalosporinas de más amplio espectro (SHV-2), dando inicio a lo que se conoce como BLEE. En Francia, un año después, se describió una TEM-3 con fenotipo semejante. En 1989 se detectó un aislado clínico de *Escherichia coli* con una enzima diferente a TEM y SHV, que se denominó CTX-M-1 por su actividad hidrolítica preferente por la cefotaxima. Se considera que las cefotaximasas CTX-M plasmídicas derivan de las penicilinasas cromosómicas naturales de *Kluyvera* spp. Tanto las secuencias de inserción (IS, del inglés Insertion Sequences) como algunos fagos estarían involucrados en este salto a los plásmidos <sup>(45)</sup>. Existen diferentes métodos para la detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido, tenemos: el método americano dado por la CLSI llamado método del doble disco, el método francés o método de Jarlier, el método de Hodge para BLEE y el método tridimensional para BLEE <sup>(46)</sup>.

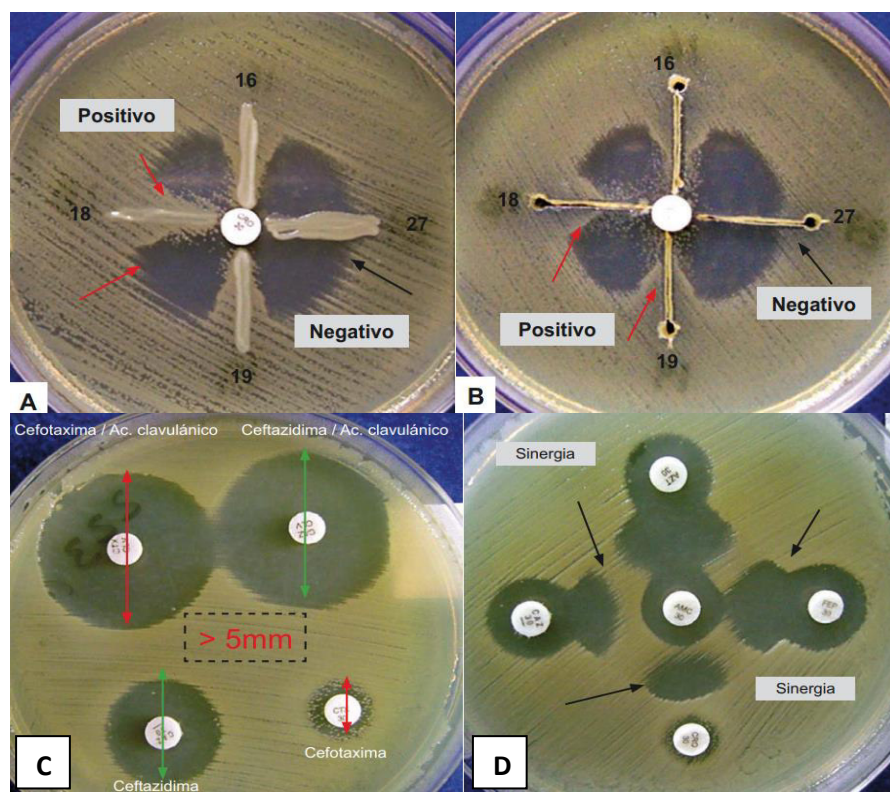


Figura 1. A. Test de Hodge, B. Método tridimensional, C. Método del doble disco (CLSI), D. Método de Jarlier, (46).

#### **1.4.2 DEFINICIÓN DE TERMINOS:**

- Reacción en cadena de polimerasa: Técnica rápida y sensible utilizada para amplificar pequeños segmentos de ADN a partir de una secuencia molde.
- Factores de virulencia: Rasgos y productos, como la capacidad para adherirse a las células o la de producir una toxina proteica o la adquisición de hierro, que le permiten al patógeno producir enfermedad.
- Susceptibilidad antimicrobiana: Características de las cepas de responder o no a las diferentes familias de antimicrobianos.
- Multidrogasresistencia: La no susceptibilidad al menos a un agente en tres o más categorías de antimicrobianos.
- UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitro
- Patotipo: Poblaciones de la misma especie que se diferencian por su capacidad patogénica.
- DAEC: Siglas de Diffusely Adherent Escherichia coli (Escherichia coli de adherencia difusa)
- Isla de patogenicidad: Fracción de ADN genómico de un microorganismo patógeno que le faculta como virulento.

### **1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPOTESIS**

La frecuencia del gen *fimH* estará por encima del 80 % (18,47,48) y del gen *afa* por debajo del 40 % (13,47,49).



## CAPÍTULO II:

### MÉTODOS

## 2.1. DISEÑO METODOLÓGICO

### 2.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Estudio cuantitativo.

### 2.1.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Transversal, descriptivo y prospectivo.

### 2.1.3. POBLACIÓN

Aislamientos clínicos de enterobacterias productoras de BLEE del cepario del proyecto TO-06/09 realizado en el INSN en el 2012, almacenadas en el laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética –LEMYG del Instituto de Medicina Tropical – “Daniel Alcides Carrión” – Facultad de Medicina - UNMSM.

### 2.1.4. MUESTRA Y MUESTREO

Se trabajaron 85 aislamientos de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de urocultivo pertenecientes al periodo Octubre – Diciembre del 2012, del cepario obtenido del proyecto TO-06/09 realizado en el INSN que están almacenadas en el laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética – LEMYG en el Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” – Facultad de Medicina - UNMSM. No se realizó muestreo para la selección de los aislamientos.

Se lograron recuperar 75 cepas viables que cumplían los criterios de selección para el presente estudio.

#### 2.1.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- *E. coli* aisladas de urocultivos positivos.
- Aislados fenotípicamente identificadas como *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de urocultivos

#### 2.1.4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Aislados de *Escherichia coli* productora de BLEE no viables al momento de la reactivación.
- Aislados de desarrollo polimicrobiano en el cultivo de reactivación.

#### 2.1.5. VARIABLES

- Presencia de genes *fimH* y *afa*:
  - Definición conceptual: Genes que codifican factores de virulencia de *Escherichia coli* (Adhesinas FimH y Afa).
  - Definición operacional: Productos de amplificación de 508 y 750 pb (*fimH* y *afa*, respectivamente).
  - Indicador *fimH*: Banda de 508 pb en corrida electroforética.
  - Indicador *afa*: Banda de 750 pb en corrida electroforética.

- Susceptibilidad antimicrobiana:
  - Definición conceptual: Características de las cepas de ser inhibidas o no por las diferentes familias de antimicrobianos.
  - Definición operacional: Sensibilidad, resistencia o sensibilidad-intermedia de bacterias a diferentes compuestos antimicrobianos.
  - Indicador: Puntos de corte según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) -2018.
  
- Procedencia de los aislados de *Escherichia coli*
  - Definición conceptual: Origen o principio de las muestras donde fueron obtenidas las muestras.
  - Definición operacional: Servicio del cual fueron obtenidas las muestras de orina para el urocultivo.
  - Indicador: Servicio del cual fueron obtenidas las muestras.
  
- Edad:
  - Definición conceptual: Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento
  - Definición operacional: Tiempo en años que ha vivido el paciente hasta el momento que fue aislado la *Escherichia coli*.
  - Indicador: Historia clínica.

## 2.1.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La información de cada aislado de *Escherichia coli* productora de BLEE será obtenida a través Formato de Recolección de Datos (**Anexo N° 1**).

## 2.1.7. PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS

### a) Reactivación de los aislados:

Los aislamientos fueron conservados en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) – glicerol 20 % a -20 °C, se reactivaron sembrando en agar Mc Conkey y luego repicando en agar Tripticasa de soya a 37 °C por 24 horas. Se evaluó el crecimiento hasta las 48 horas, luego de ese tiempo ya no se consideró para el estudio.

### b) Extracción y purificación de ADN:

En viales criovial de 1,5 mL de fondo cónico se hizo una suspensión con 4 – 5 colonias del aislamiento en 300 uL de agua grado molecular. Se homogenizó en vórtex y luego se llevó a ebullición (100 °C) durante 10 minutos en el thermoblock Digital Dry Bath Bio-Rad. Luego de la lisis con calor, se llevó al vórtex una vez más para luego centrifugar por 4 minutos a 14 000 RCF a 4 °C.

Se tomó aproximadamente 200 – 250 uL de sobrenadante de cada vial de muestra y se rotuló como ADN bacteriano para cada muestra. Se midió su concentración y pureza con el espectrofotómetro NanoDrop One de Thermo Scientific.

c) Detección del gen *fimH*:

Se utilizó el protocolo para este gen del trabajo de Tolentino E. 2017 (50), el cual tenía la siguiente secuencia de primers y volúmenes (**Tabla 3 y 4**):

**Tabla 3. Características de la secuencia de oligonucleótidos del primer de *fimH***

Gen	Secuencia (5' → 3')	pb	T° de <i>annealing</i>
<i>fimH</i>	F: TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG R: GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA	508 pb	63 °C

**Tabla 4. Mastermix de la PCR para el gen *fimH***

Reactivos	[ ] Inicial	[ ] final	vol final 1 Rx
Buffer [ X ]	10	1	2 uL
MgCl <sub>2</sub> [ mM]	50	1,5	0,6 uL
dNTPs [ mM ]	10	0,2	0,4 uL
<i>fimH</i> - f [uM ]	10	0,2	0,4 uL
<i>fimH</i> - r [ uM ]	10	0,2	0,4 uL
<i>Taq</i> [ U/uL ]	5 U/uL	0,5 U/uL	0,1 uL
H <sub>2</sub> O PCR	-	-	14,1 uL
DNA	-	-	2,0 uL
			<b>Vol final: 20 uL</b>

El protocolo de amplificación que se utilizó fue el siguiente:

- a) Desnaturalización inicial: 94 °C por 3 minutos
- b) Ciclado:
 

Fueron 30 ciclos de:

  - Desnaturalización: 94 °C por 1 minuto.
  - *Annealing*: 63 °C por 1 minuto.
  - Extensión: 72 °C por 1 minuto y una extensión final de 72 °C por 7 minutos.

d) Detección del gen *afa*:

Para este gen se buscó estandarizar a las condiciones del laboratorio y optimizar los reactivos usados en la PCR. Se trabajo la temperatura de hibridación, la concentración de primers, concentración de *Taq* polimerasa y la sensibilidad de la PCR.

En la temperatura de *annealing* (hibridación) se evaluó las temperaturas que el termociclador T100™ Thermal Cycler de BioRad, que dio 8 temperaturas cercanas a la temperatura de *annealing* que indica la bibliografía (47) (67,8 °C; 67,1 °C; 66,0 °C; 64.1 °C; 62,0 °C; 60,0 °C; 59,1 °C; 58,4 °C).

**Tabla 5. Características de la secuencia de oligonucleótidos del primer de *afa*(47)**

Gen	Secuencia (5' → 3')	pb	T° de <i>annealing</i>
<i>afa</i>	F: GCT GGG CAG CAA ACT GAT AAC TCTC R: CAT CAA GCT GTT TGT TCG TCC GCCG	750 pb	62 °C

Se utilizó como controles positivo al gen *afa* aislamientos de *Escherichia coli* obtenidas de urocultivos de otro cepario almacenado en Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética – LEMYG.

Para la concentración de primers, se evaluó 3 concertaciones: 0,16 uM, 0,1 uM y 0,08 uM. También se evaluó a la par dos concentraciones de *Taq* Polimerasa, 0,5 U/uL y 1 U/uL. Para la sensibilidad del método, se normalizó la concentración de ADN a 10 ng/uL y se hizo diluciones sucesivas hasta 1 pg/uL.

Luego del proceso de estandarización y optimización se concluyó en el siguiente protocolo:

**Tabla 6. Mastermix de la PCR para *afa***

Reactivos	[ ] Inicial	[ ] final	vol final 1 Rx
Buffer [ X ]	10	1	2,5 uL
MgCl <sub>2</sub> [ mM]	50	1,5	0,5 uL
dNTPs [ mM ]	10	0,2	0,5 uL
<i>afa</i> - f [uM ]	10	0,2	0,25 uL
<i>afa</i> - r [ uM ]	10	0,2	0,25 uL
<i>Taq</i> [ U/uL ]	5 U/uL	0,5 U/uL	0,1 uL
H <sub>2</sub> O PCR	-	-	19,9 u L
DNA	-	-	1,0 uL
			<b>Vol final: 25 uL</b>

El protocolo de amplificación del gen *afa* que se utilizó fue el siguiente:

- a) Desnaturalización inicial: 94 °C por 5 minutos.
- b) Ciclado:
 

Fueron 30 ciclos de:

  - Desnaturalización: 94° C por 1 minuto.
  - *Anneling*: 62 °C por 1 minuto.
  - Extensión: 72 °C por 1 minuto.
- c) Extensión final de 72 °C por 5 minutos.

Luego de la amplificación de los dos genes, se hizo una electroforesis para poder visualizar el producto obtenido. Se usó un gel de agarosa al 1,5% (p/v) con 5 uL de Red Safe™ (20 000 X) para cada 100 mL de Buffer TAE 1X. Las muestras se corrieron a un voltaje de 100 V durante 40 minutos. Las muestras se cargaron en los pocillos añadiendo 1 uL de Dye de carga con 4 uL de muestra. Para identificar el tamaño del producto se usó un marcador (Ladder) de 100 pb Plus GeneOn.



Luego de la corrida, el gel fue puesto en un transiluminador UV Cleaver Scientific Ltd. para poder evidenciar las bandas de las muestras, controles y Ladder. Los datos obtenidos fueron registrados en un cuaderno de trabajo y en un Excel para su posterior análisis en el paquete estadístico SPSS 25.

#### 2.1.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se trabajó con aislados bacterianos y no se consideró el nombre del paciente ni la historia clínica, por lo que no se considera necesario el consentimiento informado. El estudio sigue los lineamientos de las buenas prácticas y de ética en investigación biomédica.

## CAPÍTULO III:

## RESULTADOS

## DATOS GENERALES

Se analizaron un total de 75 muestras de ADN bacteriano obtenidas de los aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de urocultivos almacenadas en el cepario del laboratorio de Epidemiología y Genética Molecular -LEMYG. El 28% de los aislados pertenecían al sexo masculino (21/75) y un 72% (54/75) al sexo femenino. Las edades estaban en un rango desde 1 mes hasta los 14 años, con un promedio de 4 años.

**Tabla 7. Distribución de las muestras por grupo etario en la niñez\***

Grupo etario	Frecuencia
Menor o igual a 5 años	46 (61,3%)
Mayor de 5 años	29 (38,7 %)

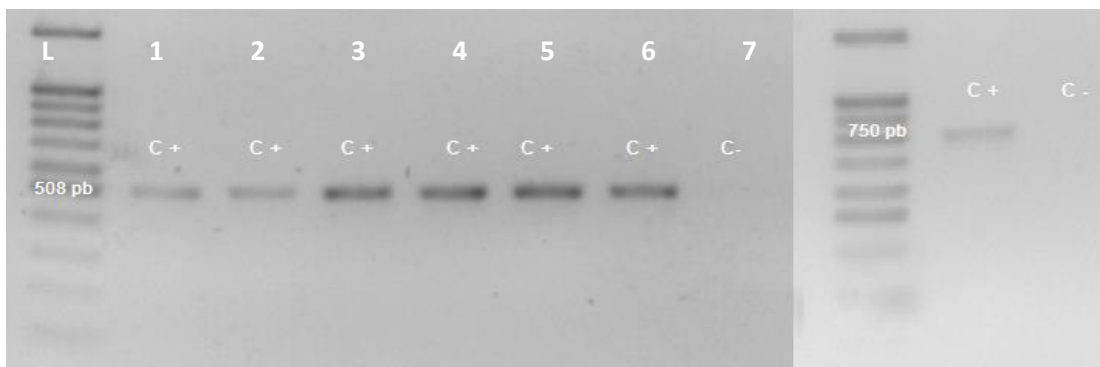
**Clasificación según Servin 2014 (15).**

**Tabla 8. Distribución de las muestras según servicio de procedencia**

Localización	Consultorio/Servicio	Frecuencia (n=75)
<b>Ambulatorios</b>		52 (69,3 %)
	Consulta externa	44
	Emergencia	8
<b>Hospitalizados</b>		23 (30,7 %)
	Neumología	1
	Neurocirugía	4
	Cardiología	2
	Cirugía	1
	Ginecología	1
	Medicina interna	5
	Nefrología	2
	Neurología	2
	Traumatología	2
	UCI	2
	Urología	1

ENSAYOS DE PCR PARA *fimH* y *afa*

- Las extracciones de ADN se realizaron por el método de lisis por calor (51). La concentración promedio de ADN extraído y purificado fue de 26,7 ng/uL con un rango entre 15 ng/uL hasta 49,7 ng/uL. Además, se realizó la prueba de pureza con la relación 260/280 nm y 260/230 nm. Para la relación 260/280 nm se obtuvo un promedio de 1,9 con un rango entre 1,7 – 2,1. Y para la relación 260/230 nm, un promedio de 0,98 con un rango entre 0,5 – 1,2 (**Anexo N°2**).
- Antes de estandarizar la PCR y correr las muestras para cada gen, se hizo un ensayo con los controles para verificar su correcto funcionamiento. El control (+) tanto para *fimH* como para *afa* dieron los resultados esperados.



**Fotografía 1.** Izquierda. Controles (+) y (-) para *fimH* (508 pb), Derecha. Control (+) y (-) para *afa* (750pb). Del 1-6 distintos controles (+).

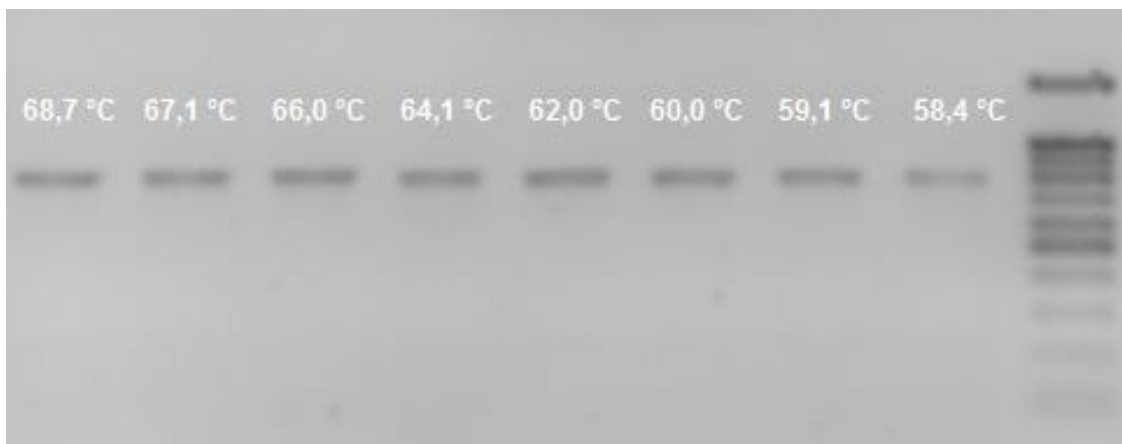
- La frecuencia del gen *fimH* obtenida en este estudio fue de 98,7 % (74/75) y dando solo una muestra negativa (1,3%) (**Anexo N°3**).

- Para el gen *afa*, el protocolo usado fue capaz de detectar concentraciones de ADN bacteriano de hasta 400 pg/uL. En la estandarización de temperatura de *annealing*, se realizó una gradiente de temperatura desde 68,7 °C hasta 58,4 °C (**Fotografía 2**).

Se corroboró que la temperatura de 62 °C es una temperatura óptima para la hibridación de este gen. En la optimización de la concentración de *Taq* y primers, se obtuvo que la concentración óptima para la *Taq* polimerasa fue 0,05 U/uL y para los primers fue de 0,1 uM (**Fotografía 3**). La corrida electroforética para visualizarlos productos fue similar a la del gen *fimH*.

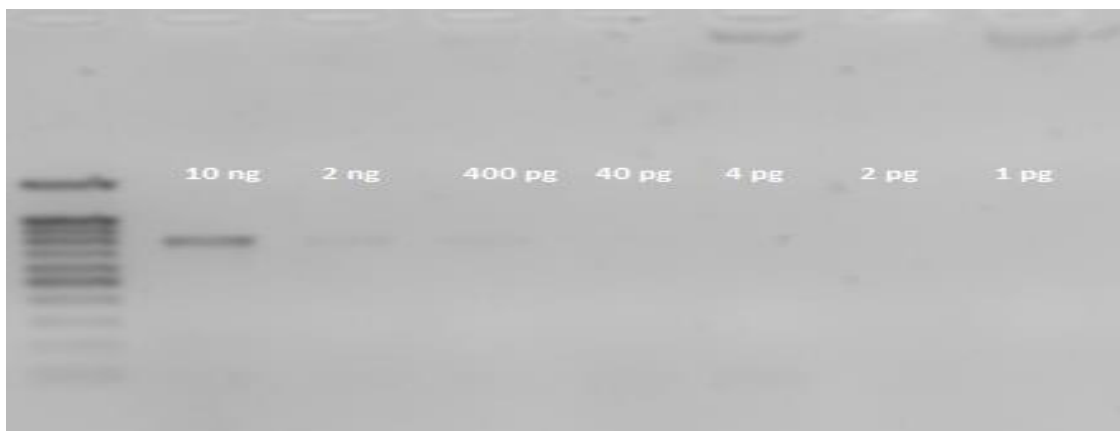
La frecuencia encontrada en el presente trabajo fue de 8 % (6/75) para el gen *afa*, dando la gran mayoría negativas para esta PCR (**Anexo N°4**).

Todas las cepas que dieron positivo para el gen *afa* tuvieron también el gen *fimH*.

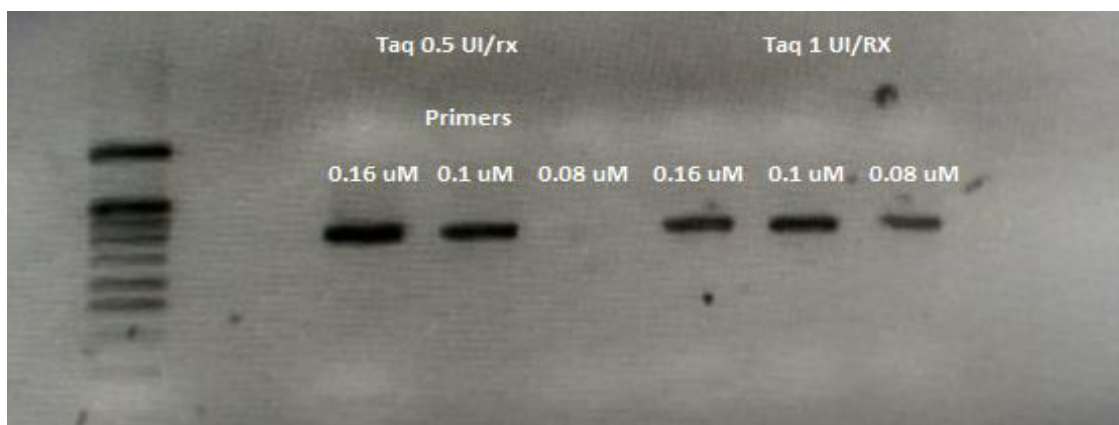


**Fotografía 2. Estandarización de la temperatura de *annealing* del gen *afa*.**

Electroforesis en gel de agarosa 1,5 % en buffer TAE 1x, con Red Safe™. De izquierda a derecha: A hasta H (68,7 °C; 67,1 °C; 66,0 °C; 64,1 °C; 62,0 °C; 60,0 °C; 59,1 °C; 58,4 °C).



**Fotografía 3. Sensibilidad de la PCR para el gen *afa*.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% en buffer TAE 1x, con Red Safe™. De izquierda a derecha: Ladder 100 pb, gradiente de concentraciones de 10 ng/uL hasta 1 pg/dL. Dio positivo hasta 400 pg/uL.

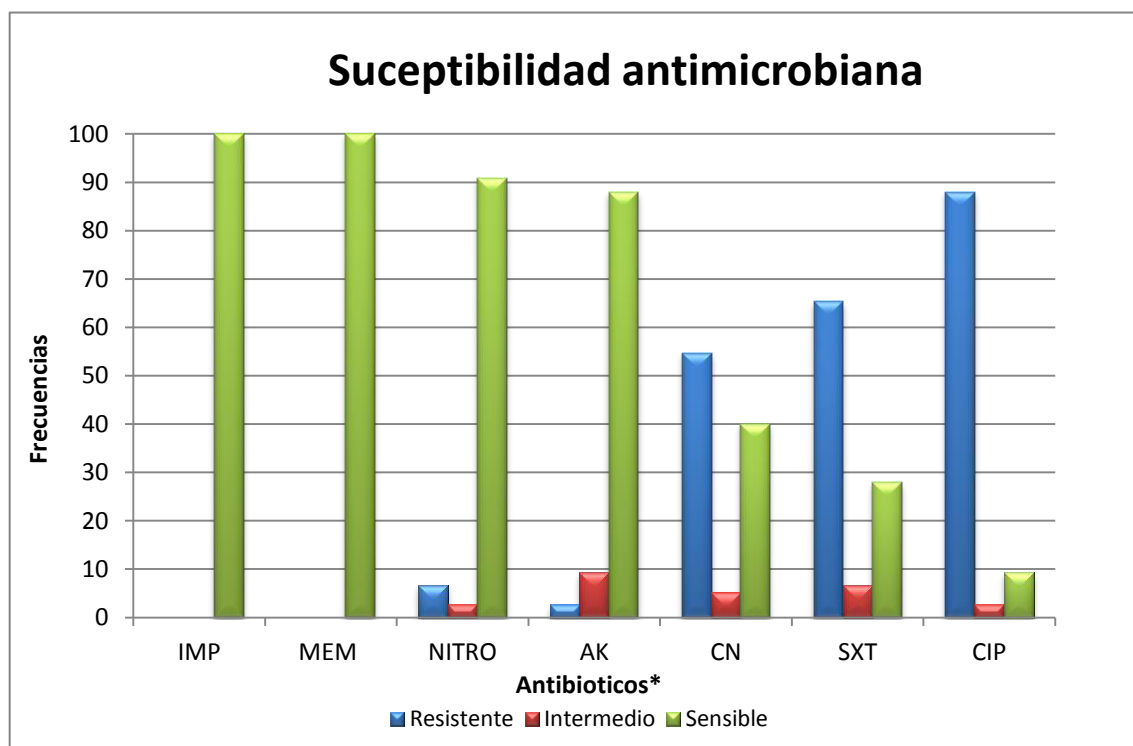


**Fotografía 4. Estandarización de concentración de primers y de *Taq* Polimerasa para el gen *afa*.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% en buffer TAE 1x, con Red Safe™. De izquierda a derecha: Ladder 100 pb, *Taq* 0.5 UI/uL con 0.16, 0.1 y 0.08 uM de primers; y *Taq* 1UI/uL con 0,16; 0,1; 0,08 uM de primers.

## RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Se obtuvieron los datos de 7 antibióticos evaluados en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión y tomando en cuenta los puntos de corte del manual M-100 del CLSI 2018. No hubo diferencias en la interpretación de los halos de inhibición con el manual M-100 del CLSI 2012 con el del año 2018. El antibiótico con mayor frecuencia de resistencia fue ciprofloxacino con 88 % seguido de sulfa-trimetropim con 65,3 %. Por otro lado, todas las cepas fueron sensibles a los carbapenémicos, imipenem y meropenem siguiendo en frecuencia nitrofurantoína (90,7 %) y amikacina (88 %) (Tabla 9).

**Tabla 9. Perfil de resistencia los antimicrobianos de los aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE (n= 75).**



\*IMP. Imipenem, MEM. Meropenem, NITRO. Nitrofurantoína, AK. Amikacina, CN. Gentamicina, SXT. Sulfa-trimetropim, CIP. Ciprofloxacino.

En relación a la multirresistencia, se observó que el 87 % tenía resistencia múltiple a cefotaxima y ciprofloxacino, 64 % resistencia a cefotaxima y sulfa-trimetropim, y un 56 % resistencia simultánea a cefotaxima, ciprofloxacino y sulfa-trimetropim. Cabe mencionar que este perfil fenotípico de resistencia múltiple (cefotaxima, ciprofloxacino y sulfa-trimetropim).

## RELACIÓN ENTRE FACTORES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

Se buscó la asociación entre la presencia de factores de virulencia y los resultados de la susceptibilidad antibiótica sin encontrar evidencia significativa de dependencia entre las variables, excepto para *afa* y la resistencia a amikacina. Para el gen *afa*, se observó que las cepas que dieron positivo a este gen, fueron resistentes a ciprofloxacino y cefepime. Para *fimH* tampoco se encontró evidencia significativa de dependencia con la susceptibilidad antibiótica, pero se observó que casi todos los aislamientos resistentes a amikacina, Cefoxitina y nitrofurantoína (100 %, 88 % y 100 %, respectivamente) eran positivos a la adhesina FimH.

**Tabla 10. Relación entre factores de virulencia y la resistencia antibiótica en los aislamientos de *Escherichia coli* productora de BLEE (n=75).**

Gen		ANTIBIÓTICO				
		AK	CN	CIP	NIT	SXT
		R	R	R	R	R
Afa	Ausente	6	42	62	6	49
	Presente	3	3	6	1	5

NIT. Nitrofurantoína, AK. Amikacina, CN. Gentamicina, SXT. Sulfa-trimetropim, CIP. Ciprofloxacino.



## RELACIÓN ENTRE FACTORES DE VIRULENCIA Y PROCEDENCIA DE LOS AISLADOS

Con respecto a los factores de virulencia y su relación a la procedencia de las cepas, no se observó alguna posible relación entre las variables procedencia y *fimH* ni para *afa*. La adhesina Afa estuvo presente en mayor proporción en los aislados de *Escherichia coli* de pacientes ambulatorios comparado con los hospitalizados.

**Tabla 11. Relación entre factores de virulencia y la procedencia de los aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE (n=75)**

Gen		Ambulatorio	Hospitalizado
<i>fimH</i>	Presente	51	23
	Ausente	1	0
<i>afa</i>	Presente	5	1
	Ausente	47	22

## FACTORES DE VIRULENCIA Y GRUPO ETARIO

Con respecto a la relación entre factores de virulencia y edad, no se observó una posible relación entre la presencia del gen y el grupo de etario.

**Tabla 12. Relación entre factores de virulencia de los aislamientos de *Escherichia coli* productora de BLEE y grupo etario (n=74\*)**

Gen		Menor o igual a 5 años	Mayor de 5 años
<i>afa</i>	Presente	4	2
	Ausente	42	27
<i>fimH</i>	Presente	46	28
	Ausente	0	1

\*Se perdió un valor de edad de un aislamiento.

## CAPÍTULO IV:

## DISCUSIÓN

#### 4. DISCUCIONES:

En este estudio se evaluó la frecuencia del gen de la adhesina FimH en *Escherichia coli* aisladas de urocultivo de una población pediátrica, en donde se encontró un 99% de positividad a este gen.

Lo encontrado en este estudio, concuerda con Kim D. *et al.* 2018 <sup>(52)</sup> quien encontró una frecuencia del 100% para la adhesina FimH en aislamientos de *Escherichia coli* aisladas de urocultivos de niños y que estaba relacionado, junto con otros factores de virulencia, a los filogrupos B2 y D. No se encontró más referencias bibliográficas de estudios de estos factores de virulencia (FimH y Afa) en población pediátrica.

Tabasi M. *et al.* 2016 <sup>(47)</sup> obtuvo una frecuencia del gen *fimH* del 100% en *Escherichia coli* aisladas de cistitis, pielonefritis y bacteriuria asintomática. Por otro lado, Rahdar M. *et al.* 2015 <sup>(13)</sup> encontró una frecuencia del 95% para *fimH*. Además, encontró que no había relación de la presencia del gen y los filogrupos de ExPEC. En Irán, Hojati Z. *et al.* 2015 <sup>(48)</sup> encontró una frecuencia de 92,8% de cepas positivas a *fimH*. En Mongolia, Munkjdelger Y. 2017 <sup>(18)</sup> obtuvo una frecuencia de 89,9% y no encontró asociación entre la presencia del gen y el filogrupo de la cepa ni con la sensibilidad antibiótica.

En México, Paniagua G. *et al* 2015 <sup>(53)</sup> tuvo una frecuencia de *fimH* de 61,3% siendo la gran mayoría detectados en cepas de *Escherichia coli* del serotipo O15 y O25 como también menciona Momtaz H. *et al* 2013 <sup>(14)</sup> quien obtuvo una frecuencia del gen *fim* del 86,2% en las cepas UPEC y la gran mayoría estuvo distribuida entre los serotipos O15 y O25.

Berry R. *et al* 2009 <sup>(54)</sup> menciona que *fimH* es una de los genes responsables de la formación de colonias bacterianas intracelulares, estructuras que empiezan a formarse

entre 6 a 24 horas pos infección. Estas estructuras son responsables de la recurrencia de las infecciones del tracto urinario, la cronicidad de la enfermedad y la formación de reservorios quiescentes en el urotelio <sup>(55)</sup>.

Para el gen *afa*, la frecuencia hallada fue de 8 % en las cepas estudiadas, similar al 6,2% de positivos al gen *afa* encontrado por Tiba M. et al en el 2008 <sup>(56)</sup> en aislamientos de *Escherichia coli* causantes de ITU. Pero diferente al 12 % encontrado por Rahdar M. et al 2015 <sup>(13)</sup> y con el 29,5% de frecuencia encontrado por Tabasi M. et al 2016 <sup>(47)</sup>, donde encontró que la presencia del gen *afa* está asociado a cistitis y las infecciones recurrentes.

En contraste, Servin 2014 <sup>(29)</sup> asegura que en pacientes con pielonefritis está presente en *Escherichia coli* el gen *afa*, en especial el subtipo *afaE*. Además, menciona que está asociado a infecciones del tracto urinario en menores de 5 años, tal y como se evidenció en este estudio, donde los aislamientos positivos para el gen fueron en su mayoría de pacientes menores de 5 años. Tajbakhsh et al. 2016 <sup>(49)</sup> nos muestra una frecuencia del 32 % para el gen *afa*, además de encontrar evidencia significativa de asociación entre el gen *afa* y la producción de biofilm, siendo esta última característica una condición asociada a la presencia de genes de betalactamasas.

Souza A. et al 2017 <sup>(57)</sup> en su estudio tiene como resultado una frecuencia del gen *afa* de 9 %, y nos muestra que la presencia de *afa* en aislados de *Escherichia coli* uropatógenas no tiene relación con el filogrupo de la cepa ni con el género del paciente donde se aisló. Najafi A. et al. 2018 <sup>(11)</sup> encontró una frecuencia del gen *afa* de 10,7 % en cepas de UPEC, no encontró diferencia significativa entre los filogrupos. Blanco et al. 2013 <sup>(58)</sup>, estableció al gen *afa* (operón *afa* FM955459) como un marcador de virotipos (grupos de *Escherichia coli* en función de sus factores de virulencia) en aislados de *Escherichia coli* ST131. Además, encontró que todos los aislados que eran *afa* FM955459 positivos (virotipo A) tenían los genes *bla<sub>CTXM-15</sub>*, *aac (6')-Ib-cr* (enzima para la resistencia a amiglicósidos y quinolonas) y la secuencia de inserción *IS26*.

Derakhshan *et al.* 2018 <sup>(59)</sup> en la India, encontró una frecuencia de 10,6 % de positivos al gen *afa* en aislamientos de *Escherichia coli*, y con relación a la susceptibilidad antibiótica, encontró que la frecuencia de *afa* en estos aislamientos es mayor en las *Escherichia coli* sensibles a amikacina, tetraciclina y nitrofurantoína. En el presente estudio, la distribución de positivos al gen *afa* fue de igual manera para nitrofurantoína que lo encontrado por Derakhshan *et al.* 2018, pero diferente para amikacina, donde se obtuvo el mismo número de positivos para el gen *afa* en aislados resistentes y sensibles.

En relación a resistencia antibiótica acompañante, Jayaweera A. *et al.* en 2018 <sup>(60)</sup>, encontró en su estudio de las ITUs en pacientes pediátricos, que de los aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE eran en su mayoría sensibles a meropenem y amikacina (96% y 90,5%; respectivamente) siendo similar con lo encontrado en este estudio ( 100 % de sensibilidad para meropenem y 88 % para amikacina).

La sensibilidad a gentamicina, sulfa-trimetropim, nitrofurantoína, fue diferente a lo encontrado en este estudio, con frecuencias de 30 % para nitrofurantoína, 17,3 % para gentamicina y 18,9 % para sulfa-trimetropim. Diferente a lo encontrado por Seung B. *et al.* 2015 <sup>(61)</sup>, donde en pacientes pediátricos tuvo aislamientos de *Escherichia coli* uropatógenas productoras de BLEE con 100% de sensibilidad a los carbapenémicos y amikacina, ciprofloxacino con 53,3 %; sulfa-trimetropim con 59,1 % y gentamicina con 72,7 %.

Madhi F. *et al.* 2018 <sup>(62)</sup> obtuvo en aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE aislados en niños, una frecuencia de sensibilidad para amikacina, imipenem, nitrofurantoína y sulfa-trimetropim (88,7 % ; 99,6 %; 92,8 % y 29,6 %, respectivamente) similar a la obtenida en este estudio (88 %; 100 %; 90,7 % y 28 %, respectivamente). Karaaslan *et al.* 2015 <sup>(63)</sup>, en un estudio sobre la eficacia del ertapenem en el tratamiento de las infecciones del tracto urinario por *Escherichia coli* productoras de BLEE en niños,

describió una frecuencia de resistencia a gentamicina del 29,9 %, a nitrofurantoína del 20,8 % y sulfa-trimetropim del 59,7 % y ningún aislamiento resistente a carbapenémicos.

Polat *et al.* 2017 <sup>(64)</sup>, en un estudio sobre el tratamiento con amikacina para los aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de urocultivos en pacientes pediátricos, obtuvo una frecuencia del 100 % de sensibilidad para amikacina y carbapenémicos, 16 % de resistencia a gentamicina y 26 % a ciprofloxacino. Además, obtuvo que el 96 % de los pacientes tratados con amikacina tuvieron una respuesta clínica favorable, y no hubo reacciones adversas como ototoxicidad o nefrotoxicidad.

## CAPÍTULO V:

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



## 5.1. CONCLUSIONES:

- La optimización de la PCR para el gen *afa* permitió identificar el factor de virulencia en las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de urocultivos.
- Se halló una alta frecuencia del gen *fimH* en las *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de urocultivos.
- No se observó relación entre la presencia del gen *fimH* y edad, procedencia y perfil de resistencia.
- No se observó relación entre la presencia del gen *afa* y edad ni con la procedencia.
- Se observó una posible relación entre la presencia del gen *afa* y la resistencia a amikacina en los aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE aislados de urocultivos.
- Los aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE multirresistentes aún son susceptibles a antimicrobianos como aminoglucósidos y carbapenémicos.

## 5.2. RECOMENDACIONES:

Se recomienda realizar:

- Estudios incluyendo más genes de factores de virulencia (adhesinas, sideróforos, toxinas, etc.) para conocer la capacidad de producir enfermedades de las cepas que circulan en nuestro medio y poder así establecer el pronóstico de las enfermedades.
- Estudios de las clonas de *Escherichia coli* de importancia clínica y epidemiológica, para conocer los genes de resistencia y factores de virulencia que poseen.
- Trabajar con mayores tamaños de muestra para el estudio de factores de virulencia de baja frecuencia, así como la interrelación con otros patotipos de *Escherichia coli*.
- Hacer estudios de cepas productoras de BLEE no solo a nivel fenotípico sino también genotípico, para conocer los genes que están en los gérmenes con los que convivimos y el estudio de otros mecanismos de resistencia a los betalactámicos como las AmpC, Carbapenemasas, OXAs que tienen un gran impacto en el tratamiento de las enfermedades por Gram negativos.
- Realizar estudios de factores de virulencia y susceptibilidad antibiótica no solo de cepas UPEC, sino de todas las ExPEC para tener datos y buscar asociaciones entre los distintos factores de virulencia y el desarrollo de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Alós J. Epidemiología y etiología de la infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. :3-8.
2. Foxman B, Gillespie B, Koopman J, Zhang L, Palin K, Tallman P, et al. Risk factors for second urinary tract infection among college women. *Am J Epidemiol*. 2000;151(12):1194-205.
3. Vázquez A. Infección urinaria en el adulto. *Rev Cuba Med*. 1995;34(2):106-17.
4. Practice parameter: the diagnosis, treatment, and evaluation of the initial urinary tract infection in febrile infants and young children. American Academy of Pediatrics. Committee on Quality Improvement. Subcommittee on Urinary Tract Infection. *Pediatrics*. 1999;103(4 Pt 1):843-52.
5. Gonzalo de Lira R. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de la AEP: Infectología pediátrica. 3ra edición. España:ERGON; 2011.p.125-134.
6. Warren J, Abrutyn E, Hebel J, Johnson J, Schaeffer A, Stamm W. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1999;29(4):745-58.
7. Hooton T, Scholes D, Gupta K, Stapleton A, Roberts P, Stamm W. Amoxicillin-clavulanate vs ciprofloxacin for the treatment of uncomplicated cystitis in women: a randomized trial. *JAMA*. 2005;293(8):949-55.
8. Scholes D, Hooton T, Roberts P, Gupta K, Stapleton E, Stamm W. Risk factors associated with acute pyelonephritis in healthy women. *Ann Intern Med*. 2005;142(1):20-7.
9. Arenas M. Identificación de *Escherichia coli* uropatógena por reacción en cadena de la polimerasa multiplex y serotipificación. En: IV Congreso Nacional e Tecnología aplicada a la Ciencias de la Salud: 6,7 y8 de Junio de 2013. Puelba, México. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México;2013.p.1-5.
10. Spaulding C, Klein R, Ruer S, Kau A, Schreiber H, Cusumano Z, et al. Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist. *Nature*. 2017;546(7659):528-32.
11. Najafi A, Hasanpour M, Askary A, Aziemzadeh M, Hashemi N. Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of

- uropathogenic *Escherichia coli* isolates. Folia Microbiol (Praha). 2018;63(3):335-43.
12. Bouguenec C, Garcia MI, Ouin V, Desperrier J, Gounon P, Labigne A. Characterization of plasmid-borne afa-3 gene clusters encoding afimbrial adhesins expressed by *Escherichia coli* strains associated with intestinal or urinary tract infections. Infect Immun. 1993;61(12):5106-14.
  13. Rahdar M, Rashki A, Miri HR, Rashki Ghalehnoo M. Detection of pap, sfa, afa, foc, and fim Adhesin-Encoding Operons in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates Collected From Patients With Urinary Tract Infection. Jundishapur J Microbiol [Internet]. 17 de agosto de 2015 [citado 30 de junio de 2018];8(8). Disponible en: <http://jjmicrobiol.com/en/articles/56507.html>
  14. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpour Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 29 de abril de 2013;12:8.
  15. Servin AL. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. Clin Microbiol Rev. octubre de 2014;27(4):823-69.
  16. Hernández Álvarez E, Rodríguez-Avial C. *Escherichia coli* productores de BLEE aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria [Internet]. 2010 [citado 16 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://site.ebrary.com/id/10526689>
  17. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. octubre de 2005;18(4):657-86.
  18. Munkhdelger Y, Gunregjav N, Dorjpurev A, Juniichiro N, Sarantuya J. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. J Infect Dev Ctries. 30 de enero de 2017;11(1):51-7.
  19. Robino L, Scavone P, Araujo L, Algorta G, Zunino P, Pérez MC, et al. Intracellular Bacteria in the Pathogenesis of *Escherichia coli* Urinary Tract Infection in Children. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 de diciembre de 2014;59(11):e158-64.
  20. Foxman B, Zhang L, Tallman P, Palin K, Rode C, Bloch C, et al. Virulence characteristics of *Escherichia coli* causing first urinary tract infection predict risk of second infection. J Infect Dis. 172(6):1536-41.
  21. Grabe M., Bartoletti R. et al. Guidelines on urological infections. Euro Asoc of Uro. 2015.

22. Soto J., Guillen A., Rojas R. Manual de procedimientos microbiológicos. Sociedad científica Per Micribiol. 2012;1(1):1-36.
23. Kass H. Asymptomatic infections of the urinary tract. 1956. J Urol. 2002;167(2):1-3.
24. Burd EM, Kehl KS. A Critical Appraisal of the Role of the Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Urinary Tract Infections. J Clin Microbiol. septiembre de 2011;49(9 Suppl):S34-8.
25. Echevarría J., Aguilar E., Osorio F. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. Act Med Per. 2006;23(1):26-31.
26. Suarez C. Análisis de perfiles plasmídicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido aisladas en urocultivos en el Instituto Nacional de Salud del Niño. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina;2015.
27. Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E. Koneman Diagnóstico microbiológico. Buenos Aires: Ed Panamericana; 2008.
28. Goldstone R, Popat R, Schuberth H, Sandra O, Sheldon IM, Smith D. Genomic characterisation of an endometrial pathogenic *Escherichia coli* strain reveals the acquisition of genetic elements associated with extra-intestinal pathogenicity. BMC Genomics [Internet]. 6 de diciembre de 2014 [citado 30 de junio de 2018];15(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4298941/>
29. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. Dis Mon DM. 2003;49(2):53-70.
30. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. 2008;85(1):11-9.
31. Subashchandrabose S, Mobley HLT. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. Microbiol Spectr. 2015;3(4).
32. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. Int J Nephrol. 2012;681473.
33. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015;13(5):269-84.
34. Mulvey MA. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. Cell Microbiol. 2002;4(5):257-71.

35. Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, Bui H, Le Bouguénec C, Denamur E. A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol*. 2004;21(6):1085-94.
36. Gérardin J, Lalioui L, Jacquemin E, Le Bouguénec C, Mainil JG. The afa-related gene cluster in necrotoxicogenic and other *Escherichia coli* from animals belongs to the afa-8 variant. *Vet Microbiol*. 2000;76(2):175-84.
37. Khasheii B, Anvari S, Jamalli A. Frequency evaluation of genes encoding siderophores and the effects of different concentrations of Fe ions on growth rate of uropathogenic *Escherichia coli*. *Iran J Microbiol*. 2016;8(6):359-65.
38. Pichon C, Héchard C, du Merle L, Chaudray C, Bonne I, Guadagnini S, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* AL511 requires flagellum to enter renal collecting duct cells. *Cell Microbiol*. 2009;11(4):616-28.
39. Chen M, Tofighi R, Bao W, Aspevall O, Jahnukainen T, Gustafsson LE, et al. Carbon monoxide prevents apoptosis induced by uropathogenic *Escherichia coli* toxins. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2006;21(3):382-9.
40. Mills M, Meysick KC, O'Brien AD. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect Immun*. 2000;68(10):5869-80.
41. Avellaneda J, Pecho E. Resistencia a los antibacterianos en el CENEMA de enero a diciembre del 2000. [tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2000.
42. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. 2008;(3):10.
43. Moreno M C, González E R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello*. agosto de 2009;69(2):185-92.
44. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. marzo de 2010;54(3):969-76.
45. García CS, de la Gándara MP, García FJC. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. enero de 2010;28:12-8.
46. Lezameta L, Gonzáles-Escalante E, Tamariz JH. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. septiembre de 2010;27(3):345-51.

47. Tabasi M. Genotypic Characterization of Virulence Factors in *Escherichia coli* Isolated from Patients with Acute Cystitis, Pyelonephritis and Asymptomatic Bacteriuria. J Clin Diagn Res. 2016; 10(2):1-7.
48. Hojati Z, Molaie R, Gholipour A. The FimH Gene in Uropathogenic *Escherichiacoli* Strains Isolated From Patient With Urinary Tract Infection. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(2):1-6.
49. Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N, Khamesipour F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. Antimicrob Resist Infect Control. 2016;5(11):1-8.
50. Tolentino E. Detección genotípica de los factores de virulencia: Fimbria tipo 1, Fimbria P y alfa hemolisina en *Escherichia coli* aisladas de urocultivos, Hospital Nacional Madre-Niño San Bartolomé. Febrero-Abril, 2015. [tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina;2015.
51. Neamati F, Firoozeh F, Saffari M, Zibaei M. Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Pattern in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated From Hospitalized Patients in Kashan, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(2):1-6.
52. Kim D, Subhadra B, Kang H, Woo K, Kim J, Son Y, et al. Virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection in Korea. Genes Genomics. 2018;40(6):625-34.
53. Paniagua G, Monroy E, Rodríguez R, Domínguez P, Vaca F, Vaca S. Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi 2017;50(4):478-85.
54. Berry R., Klumpp D., Schaeffer A. Urothelial cultures support Intracellular Bacterial Community Formation by uropathogenic *Escherichia coli*. Journal Infect Immun. 2009; 77(7):2762-72.
55. Hanna T., Totsika M., Mansfield K. Host-Pathogen Checkpoints and Population Bottlenecks in Persistent and Intracellular Uropathogenic *E. coli* Bladder Infection. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(3):616-648.
56. Tiba M, Yano T, Leite D. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2008;50(5):255-60.

57. De Souza A, De Sousa V, Martins N, da Silva R, Bonelli R, Riley L, et al. *Escherichia coli* sequence type 73 as a cause of community acquired urinary tract infection in men and women in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;88(1):69-74.
58. Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, et al. Four Main Virotypes among Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: Bacterial, Epidemiological, and Clinical Characteristics. *J Clin Microbiol*. 2013;51(10):3358-67.
59. Derakhshan S, Pourzare M, Roshani D. Distribution of Virulence Factors According to Antibiotic Susceptibility among *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection. *Indian J Nephrol*. 2018;28(3):191-7.
60. Jayaweera JAAS, Reyes M. Antimicrobial misuse in pediatric urinary tract infections: recurrences and renal scarring. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2018.
61. Han S, Lee S, Lee S, Jeong D, Kang J. Aminoglycoside therapy for childhood urinary tract infection due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Infect Dis*. 2015; 15:414.
62. Madhi F, Jung C, Timsit S, Levy C, Biscardi S, Lorrot M, et al. Febrile urinary-tract infection due to extended-spectrum beta-lactamase–producing Enterobacteriaceae in children: A French prospective multicenter study. *PLoS ONE*. 2018; 13(1):1-14.
63. Karaaslan A, Kadayifci E, Atici S, Akkoc G, Yakut N, Öcal Demir S, et al. The Clinical Efficacy and Safety of Ertapenem for the Treatment of Complicated Urinary Tract Infections Caused by ESBL-Producing Bacteria in Children. *Int J Nephrol*. 2015; 1:4.
64. Polat M, Kara SS. Once-daily intramuscular amikacin for outpatient treatment of lower urinary tract infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in children. *Infect Drug Resist*. 2017;10:393-9.



## ANEXOS

## Anexo N° 1: Ficha de recolección de datos

<b>FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE AISLAMIENTOS DE <i>Escherichia coli</i> BLEE</b>
--

<b>Código:</b>		<b>Servicio/consultorio:</b>	
----------------	--	------------------------------	--

<b>Edad:</b>		<b>Sexo:</b>	
--------------	--	--------------	--

<b>Antibiograma:</b>		<b>Clasificación según CLSI-2018</b>		
	Halo mm	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
<b>Amikacina 30 ug</b>				
<b>Gentamicina 10 ug</b>				
<b>Ciprofloxacino 5 ug</b>				
<b>Nitrofurantoína 300 ug</b>				
<b>Sulfametoxazol/ Trimetropim 1.25/23.75 ug</b>				
<b>Ceftazidima 30 ug</b>				
<b>Cefepime 30 ug</b>				
<b>Imipenem 10 ug</b>				
<b>Meropenem 10 ug</b>				
<b>Amoxi/Clav. 3ug</b>				
<b>Cloranfenicol 30 ug</b>				
<b>Cefoxitina 30 ug</b>				

<b>F. virulencia:</b>		
	<b>SI</b>	<b>No</b>
<b><i>fimH</i></b>		
<b><i>afa</i></b>		

**Anexo N° 2: Concentraciones de ADN bacteriano de las muestras recolectadas**

	<b>PROM [ng/uL]</b>	<b>RATIO 260/280</b>	<b>RATIO 260/230</b>
156	16,8	1,9	0,9
158	17,3	1,9	1
159	46,8	1,9	1,1
161	29,3	1,9	1,1
163	44,7	1,9	1,1
166	25,2	1,9	1
167	16,6	1,8	1
168	17	1,8	0,8
170	27,6	1,9	0,8
171	20,9	1,8	1
173	26,5	1,9	1,1
176	41,6	1,9	1,1
177	27,9	1,9	1
180	24,3	1,9	1
182	40,6	1,9	1,1
184	31,8	1,9	1
187	22,9	1,9	0,9
188	28,3	1,9	0,9
190	26,8	1,8	0,9
192	23,4	1,8	1
193	26,3	1,8	1
198	25,3	2	1,2
199	24	1,8	1,1
201	21,8	2	1
202	22,4	1,9	1
204	20	1,8	0,8
206	21,8	2	1
207	31,9	1,9	0,9
209	23,4	1,9	1
210	26	1,8	1
212	23,2	1,8	1
214	24,9	1,8	1
216	37,2	1,8	0,9
219	21,8	2	1
222	22,4	1,8	0,9
224	20,3	1,8	1

228	25,5	1,9	1
230	24,2	1,8	1
241	27,9	1,9	0,5
243	17,4	1,8	0,7
244	34	2	1
245	15	2,1	0,9
247	16,5	2	0,9
253	16,4	2	0,9
254	19,7	1,9	0,9
256	33,1	2	0,9
257	33,1	2,1	1
258	28,4	2	1
262	49,7	2	1,2
264	20,1	1,9	1
266	29,5	2	1,1
267	22,4	2	0,9
268	24,3	2	0,9
270	21,1	2	0,9
271	26,4	1,9	1
273	21,8	2	1
274	25	1,9	1
279	36,7	1,9	1,1
289	36,5	1,9	1,1
290	35,1	2	1,1
293	29	2	1
300	21,3	1,9	1,1
301	38,7	2	1
304	20,8	2	0,8
313	34	2	1
314	33,8	2	1
321	32,7	2	1
323	16,7	1,9	0,9
325	21,3	1,9	1
328	19,7	1,8	0,9
330	17,9	1,7	0,8
331	22,3	1,9	1
332	38	2	0,9
334	20,8	1,9	1,1
335	32,9	1,9	0,9

### Rangos de normalidad:

Ratios	Valor	Pureza
Ratio 1 (260/280 nm)	> 2.1	Contaminación con ARN
	1.8-2.0	ADN de pureza óptima
	1.6-1.8	ADN pureza aceptable
Ratio 2 (260/230 nm)	< 1.6	Presencia de compuestos aromáticos
	1.5-2.2	ADN de pureza óptima
	< 1.5	Contaminación con sales, carbohidratos, fenoles

**Anexo N° 3: Puntos de corte del método de disco difusión para el test de sensibilidad antibiótica (Manual M-100 28th edition – CLSI):**

	<b>Carga del disco</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
<b>Amikacina</b>	30 ug	>= 17	15-16	<= 14
<b>Gentamicina</b>	10 ug	>= 15	13-14	<= 12
<b>Cefotaxima</b>	30 ug	>= 26	23-25	<= 22
<b>Ceftazidima</b>	30 ug	>= 21	18-20	<= 17
<b>Cefepime</b>	30 ug	>= 25		<= 18
<b>Imipenem</b>	10 ug	>= 23	20-22	<= 19
<b>Meropenem</b>	10 ug	>= 23	20-22	<= 19
<b>Cefoxitina</b>	30 ug	>= 18	15-17	<= 14
<b>Ciprofloxacino</b>	5 ug	>= 21	16-20	<= 15
<b>Nitrofurantoína</b>	300 ug	>= 17	15-16	<= 14
<b>Sulfa-trimetropim</b>	1.25/23.75 ug	>= 16	11 - 15	<= 10
<b>Amox/Clavulánico</b>	20/10 ug	>= 17	14-16	<= 13

**Anexo N° 4: Base de datos de los aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE aislados de urocultivos.**

	LOC	Edad	Sexo	FimH	Afa	AMK	GEN	CAZ	FEP	CTX	FOX	CIP	CHL	IPM	MEM	NIT	SXT
<b>156</b>	1	.	1	0	0	0	0	2	2	2	1	2	2	0	0	0	2
<b>158</b>	2	1	0	1	0	0	2	1	1	2	0	2	0	0	0	0	0
<b>159</b>	10	14	0	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	1	0
<b>161</b>	1	4	1	1	1	0	1	0	1	2	0	2	2	0	0	0	2
<b>163</b>	10	13	1	1	0	0	2	2	2	2	1	2	0	0	0	0	2
<b>166</b>	3	13	1	1	0	0	0	0	1	1	0	2	2	0	0	0	2
<b>167</b>	11	6	1	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	2
<b>168</b>	0	12	0	1	0	0	0	2	1	2	2	2	0	0	0	2	0
<b>170</b>	1	6	1	1	0	0	2	1	1	2	0	2	0	0	0	0	2
<b>171</b>	1	3	0	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	2
<b>173</b>	9	1	0	1	0	0	2	1	1	2	0	2	0	0	0	0	0
<b>176</b>	0	1	1	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
<b>177</b>	7	1	1	1	0	0	0	0	1	2	0	2	2	0	0	0	2
<b>180</b>	1	1	0	1	0	0	2	1	2	2	0	2	0	0	0	0	0
<b>182</b>	8	7	1	1	0	0	2	0	1	2	0	2	0	0	0	0	2
<b>184</b>	0	1	1	1	0	0	2	0	1	2	0	2	0	0	0	0	2
<b>187</b>	0	8	1	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	2	2
<b>188</b>	0	12	0	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
<b>190</b>	0	8	1	1	1	2	1	0	2	2	0	2	2	0	0	0	2
<b>192</b>	0	2	0	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	2
<b>193</b>	0	7	1	1	0	0	0	0	1	2	0	2	0	0	0	0	2

	LOC	Edad	Sexo	FimH	Afa	AMK	GEN	CAZ	FEP	CTX	FOX	CIP	CHL	IPM	MEM	NIT	SXT
198	3	0.41	1	1	0	0	2	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0
199	0	1	1	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
201	0	8	1	1	0	0	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	2
202	0	8	1	1	1	1	0	0	1	2	0	2	0	0	0	0	2
204	1	13	0	1	0	1	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
206	0	6	1	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	2
207	0	2	1	1	0	0	2	0	2	2	0	2	0	0	0	1	2
209	0	3	1	1	0	0	2	0	2	2	0	0	0	0	0	2	2
210	8	7	1	1	0	0	0	0	2	2	0	2	0	0	0	0	2
212	4	0.08	1	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	2
214	3	9	1	1	0	1	0	2	2	2	2	2	0	0	0	0	2
216	0	1	1	1	0	2	2	2	2	2	0	2	2	0	0	0	2
219	0	2	0	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	2
222	0	0.58	0	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
224	7	0.16	0	1	0	1	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
228	9	0.66	1	1	0	1	0	2	2	2	0	1	0	0	0	0	1
230	0	0.66	1	1	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
241	0	0.5	1	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
243	0	13	1	1	0	0	2	0	1	2	0	2	0	0	0	0	2
244	0	0.58	0	1	1	1	0	2	2	2	0	2	0	0	0	0	2
245	0	3	1	1	1	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	2	2
247	3	0.91	1	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	2
253	0	4	1	1	0	0	0	0	2	2	0	2	0	0	0	0	2
254	5	0.41	0	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	2
256	0	7	1	1	0	0	0	0	1	2	0	2	0	0	0	0	2
257	11	0.41	1	1	0	0	0	2	2	2	0	2	0	0	0	0	1



	LOC	Edad	Sexo	FimH	Afa	AMK	GEN	CAZ	FEP	CTX	FOX	CIP	CHL	IPM	MEM	NIT	SXT
258	7	1	0	1	0	0	2	0	1	2	0	2	0	0	0	0	2
262	0	0.25	0	1	0	0	0	1	2	2	0	2	0	0	0	0	2
264	0	7	1	1	0	0	0	0	1	2	S	2	2	0	0	0	2
266	0	11	1	1	0	0	0	2	1	2	2	1	0	0	0	0	2
267	0	0.25	1	1	0	0	0	0	2	2	0	2	0	0	0	0	2
268	0	1	1	1	0	0	0	1	2	2	0	2	0	0	0	0	2
270	6	8	1	1	0	0	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	1
271	12	4	1	1	0	0	2	0	1	2	0	2	0	0	0	0	2
273	0	1	1	1	0	0	0	0	1	2	0	2	0	0	0	0	2
274	0	7	1	1	0	0	1	0	1	2	0	2	2	0	0	0	2
279	4	1	0	1	1	0	0	0	1	2	0	2	0	0	0	0	0
289	0	0.5	1	1	0	0	2	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0
290	0	0.83	1	1	0	0	0	1	1	2	0	2	0	0	0	0	0
293	0	0.58	1	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
300	0	4	1	1	0	0	0	2	0	2	2	0	2	0	0	0	0
301	0	0.41	1	1	0	1	2	2	2	2	0	2	0	0	0	2	0
304	0	6	1	1	0	0	0	0	2	2	0	2	0	0	0	0	2
313	0	7	1	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	2
314	0	0.58	0	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	2
321	7	0.08	1	1	0	0	0	0	1	2	0	2	0	0	0	0	2
323	0	13	1	1	0	0	0	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
325	7	3	0	1	0	0	0	2	2	2	0	2	2	0	0	0	1
328	0	0.66	0	1	0	0	0	0	1	2	0	2	0	0	0	0	2
330	0	4	1	1	0	0	0	2	2	2	0	2	0	0	0	0	1
331	0	3	1	1	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2
332	0	1	0	1	0	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	2

<b>334</b>	1	6	1	1	0	0	2	0	1	2	0	2	2	0	0	0	2
<b>335</b>	1	6	1	1	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	2

**LEYENDA:**

**Sexo:**

Indica el sexo del paciente del cual se obtuvieron los aislados, Mujer = 0, Varón = 1.

**Edad:**

Edad expresada en años.

**Presencia del factor de virulencia a evaluado:**

NO = 0, SI = 1

**Antibióticos:** Indica la sensibilidad a los diferentes antibióticos, S = 0; I = 1; R= 2.

